

Chloroplasty – zelené organely

V září letošního roku uplyne 105 let ode dne, kdy v časopise *Biologisches Centralblatt* (1905, 25: 593–604) vyšel článek ruského botanika z univerzity v Kazani Konstantina Sergejeviče Merežkovského (1855–1921) s názvem *Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche* (O povaze a původu chromatoforů v rostlinné říši). Tato práce se dnes obecně považuje za skutečný základ teorie o endosymbiotickém původu chloroplastů, podle níž chloroplasty vznikly pohlčením původní buňky sinic (cyanobakterie, blíže také viz *Živa* 2009, 5: 200–203).

Eukaryotická buňka, která pohltila, ale nezničila buňku sinice schopnou fotosyntetické fixace energie slunečního záření a fixace oxidu uhličitého, už byla plně diferencována a obsahovala organely obalené jednou membránou (vakuola, endoplazmatické retikulum), ale i dvěma membránami (jádro a mitochondrie). Nový organismus v hostitelské buňce musel vyvolat řadu přeměn pro integraci a koordinaci metabolických procesů, ale také pro koordinovanou expresi genetické informace. Řada genů z původní buňky sinice byla převedena do jádra. Proto také syntéza mnoha bílkovin nezbytných pro stavbu a procesy probíhající v chloroplastu se uskutečňuje v cytoplazmě a musely se proto vyvinout transportní mechanismy jejich přenosu do chloroplastu. Jádro tak kontroluje a reguluje prostřednictvím proteinů transportovaných do chloroplastů procesy probíhající v těchto organelách. Současně přijímá z chloroplastů signály tak, aby jaderná a chloroplastová aktivity byly účinně koordinovány.

Kromě toho došlo k přenosu některých genů z chloroplastů do mitochondrií a řada dalších vymizela. Komunikace a následná regulace a koordinace procesů se tedy uskutečňuje mezi jádrem a oběma endosymbiotickými organelami. Tyto procesy jsou v současné době předmětem intenzivního studia. Jakkoli tedy existuje shoda o endosymbiotickém původu chloroplastů v buňkách vyšších rostlin, počet dosud nezodpovězených otázek spíše narůstá. Např. nejsou známy faktory a signální cesty, které spouštějí diferenciaci určité formy plastidu v konkrétním rostlinném pletivu – chloroplast v listu, chromoplast v plodech, amyloplast v kořenech apod.

Rodina plastidů

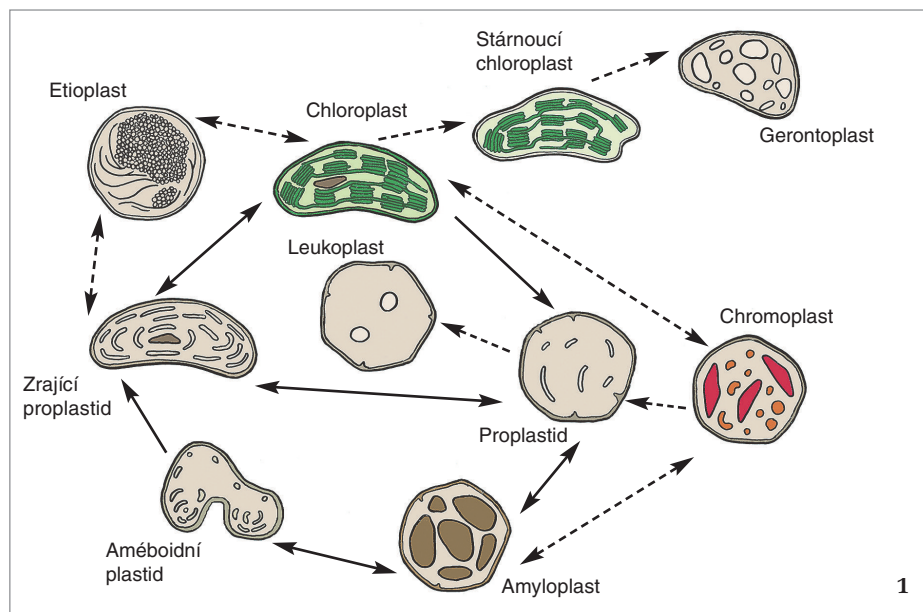
Chloroplasty jsou jedním z členů rodiny plastidů. Tyto buněčné organely nikdy v buňkách nevznikají *de novo*, ale vždy jen dělením. V průběhu evoluce zejména vyšších rostlin pak v souladu s jejich diferenciací došlo k vytváření celé řady strukturních a funkčních forem plastidů.

- Proplastidy představují výchozí typ s velmi jednoduchou vnitřní strukturou.
- Etioplasty vznikají z proplastidů v buňkách pletiv, která se nacházejí ve tmě, např. v meristematických základech listů, v pupenech apod. Obsahují již základy tylakoidů (membránové struktury, v nichž probíhá fotosyntéza, viz dále), a to ve formě jednoduchých struktur – protylakoidů. Typickým útvarem je prolamelární těleso s protochlorofylidem, z něhož následně může vzniknout chlorofyl.
- Chloroplasty vznikají na světle z proplastidů a někdy také z etioplastů.
- Leukoplasty jsou strukturně podobné etioplastům a nacházejí se zejména v buňkách kořenů.
- Amyloplasty představují určitý typ leukoplastů, které syntetizují a hromadí škrob. Tyto formy se vyskytují zejména v zásobních pletivech, jako jsou dělohy nebo hlízy. Kromě škrobu se v nich často hromadí také bílkoviny nebo lipidy, a pak získávají označení proplastidy nebo oleoplasty.
- Gerontoplasty v souladu se svým označením představují konečnou formu plastidů před jejich rozpadem.
- Chromoplasty se funkčně vzdalují ostatním typům plastidů, protože obsahují větší obsah zejména karotenoidů, a vytvářejí charakteristická zbarvení některých květních orgánů.

Chloroplast – centrum fotosyntézy

Jakkoli je struktura i velikost chloroplastů velmi proměnlivá, lze je charakterizovat jako kulovité až čočkovité nebo diskovité útvary o velikosti 2–5 μm. Tvarová proměnlivost je značná a výjimkou nejsou ani velmi nepravidelné až amébovité útvary. Každý chloroplast je od okolního prostředí buňky oddělen dvěma membránami, které se významně liší svým složením, a to jak obsahem lipidů, tak i proteinů. Selektivní vstup látek do chloroplastu, nebo naopak výstup z něho zajišťuje zejména vnitřní z uvedených dvou membrán. Celý vnitřní prostor chloroplastu označovaný jako stroma vyplňuje velmi hustý roztok enzymů, v němž lze jasně odlišit membránové struktury vytvářející charakteristické ploché váčky – tylakoidy. Ty se mohou seskupovat a vytvářet grana, která jsou nejčastěji přirovnávána ke sloupečku mincí. Kromě toho jsou ovšem v chloroplastech také tylakoidy intergranální nebo stromatální, které jednotlivá grana spojují. Vnitřní prostor tylakoidu se označuje jako lumen.

Absorpce energie záření probíhá v proteinových komplexech obsahujících fotosyntetické pigmenty – chlorofyly a karotenoidy lokalizované v membránách tylakoidů. Absorbovaná energie je využita na štěpení molekuly vody, z níž se kyslík uvolňuje do atmosféry, proton (H⁺) se hromadí ve vnitřním prostoru tylakoidu a tento protonový gradient následně energeticky zajišťuje syntézu „univerzálního energetického platidla“ – ATP. A konečně elektrony uvolněné při rozkladu vody jsou systémem přenašečů využity k tvorbě



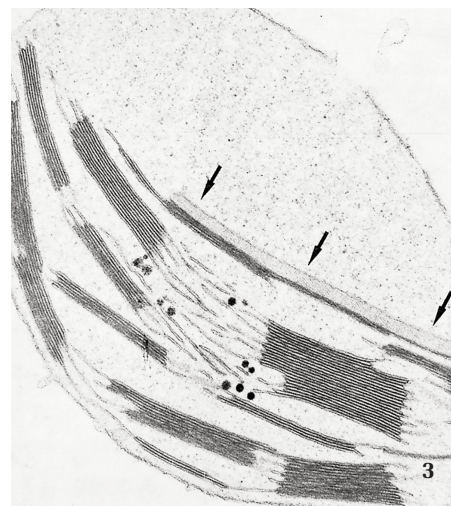
1

redukovaného $\text{NADPH} + \text{H}^+$ na vnější straně membrány tylakoidů. Produkty vytvořené v této úvodní fázi fotosyntézy, tedy ATP a NADPH, jsou využity ve stromatu chloroplastů k zabudování oxidu uhličitého do sacharidů. Ty se mohou v chloroplastech dočasně hromadit ve formě škrobu nebo jsou transportovány do cytoplazmy, kde se syntetizuje nejběžnější transportní sacharid sacharóza, případně řada dalších metabolitů.

V chloroplastech ovšem probíhá nejen fotosyntetická fixace oxidu uhličitého, ale také velmi důležitá syntéza mastných kyselin, bází nukleových kyselin a rozhodující část asimilace dusíku a síry.

Stromuli – nové struktury

Teprve koncem 90. let 20. stol. byly v chloroplastech opakovaně objeveny zvláštní struktury vyplněné stromatem chloroplastů označované jako stromuli. Tyto tubuly („trubičky“) vyčnívají z chloroplastů do cytoplazmy a dynamicky mění svou velikost. V obalu dvou membrán je stroma, v němž byl detekován i enzym Rubisco (ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza), zabezpečující primární fixaci oxidu uhličitého ve fotosyntéze. Stromuli jsou poměrně velmi četné u všech plastidů. Trochu překvapivě se jich nejméně nachází u chloroplastů. Jejich dynamická tvarová proměna se projevuje zkracováním, prodlužováním i připojováním a odpojováním od jiných plastidů v buňce, přičemž tyto délkové změny dosahují rychlosti 0,2–1,1 $\mu\text{m/s}$. Při průměrné tloušťce kolem 0,5 μm dosahují v některých případech délky i přes 20 μm . Pozorována byla



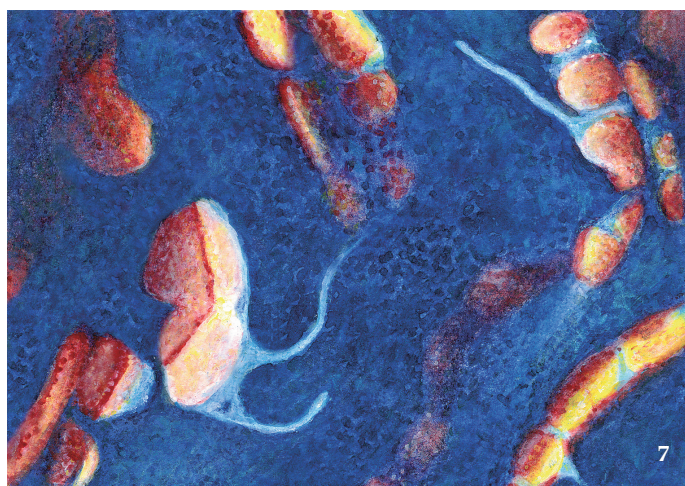
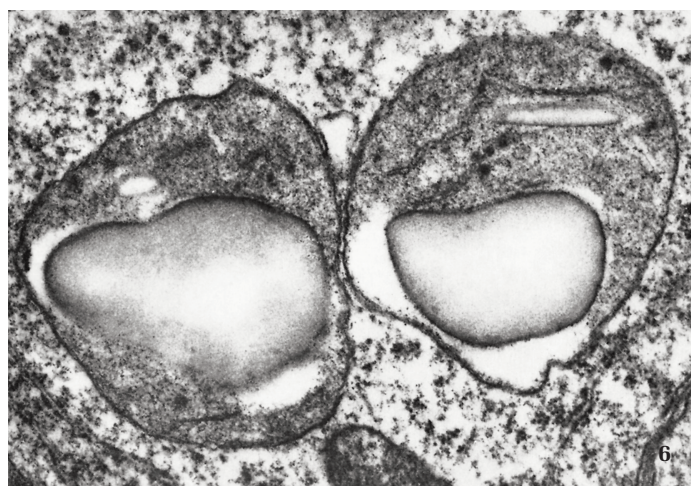
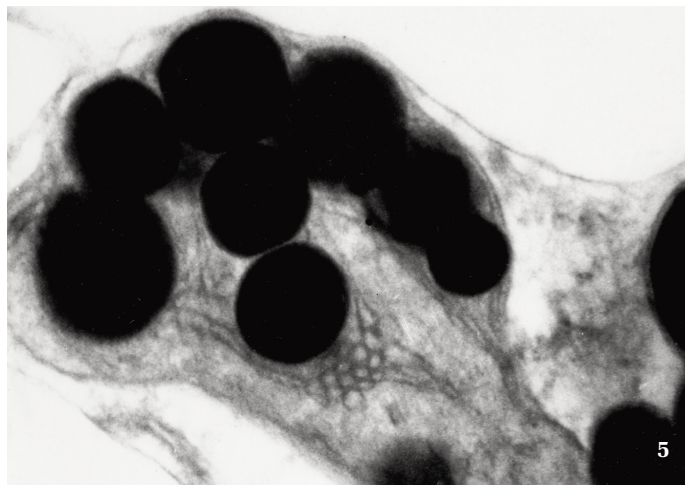
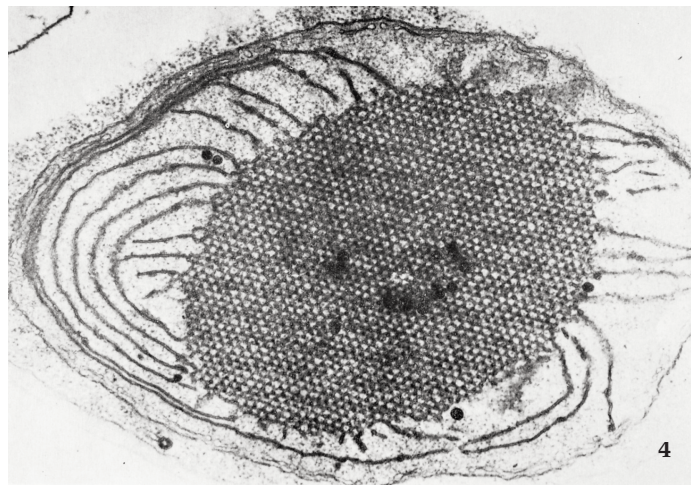
také „vezikularizace“ části stromulů. Není zatím známo, jestli jsou tyto části dále zcela degradovány, nebo vsazeny do jiných stromulů. Předpokládá se, že výrazně zvětšují povrch chloroplastů a usnadňují tak výměnu látek mezi cytoplazmou a chloroplastem. Kromě toho zřejmě zajišťují výměnu bílkovin mezi samotnými plastidy. A konečně je pravděpodobné, že se uplatňují i při stabilizaci plastidů v určité poloze a umístění v buňce. Podle některých pozorování mohou stromuli zasahovat i do jádra buňky. Někteří autoři spekulují, že právě tyto struktury mohly usnadnit migraci genů z plastidů do jádra.

Protože stromuli neobsahují chlorofyl, jsou jen obtížně zjistitelné. Zřetelné se staly až při využití zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, Green Fluorescent Pro-

tein, Köhler a kol. 1997). Následně se ukázalo, že již prakticky v průběhu celého 20. stol. se sporadicky ve vědecké literatuře objevovaly práce popisující vlákna vycházející z chloroplastů, aniž by jim ovšem byla věnována větší pozornost. Stejně tak je dnes prokázáno, že i chloroplasty obsahují plastoskelet pocházející z původní pohlčené cyanobakteriální buňky. Je to struktura podobná cytoskeletu, která usnadňuje udržování nebo změny tvaru a je důležitá při dělení plastidů.

Plastom – genetický aparát plastidů

V souladu s endosymbiotickým původem plastidů jsou tyto organely označovány jako semiautonomní, protože obsahují vlastní genetickou informaci včetně struktur zajišťujících transkripci a translaci. Tyto





procesy jsou však pod kontrolou jaderného genetického aparátu. Vedle jaderného genomu se tedy v rostlinných buňkách nachází i chloroplastový (plastidový) genom – plastom (cpDNA).

Buňky obsahují různý počet chloroplastů, v nichž je chloroplastová DNA přítomná v mnoha kopiích. Počet kopií cpDNA závisí na typu buňky a liší se mezi druhy. Mezofylové buňky vyšších rostlin mají zhruba 20–200 chloroplastů, každý s 10–50 kopiemi cpDNA; tyto počty však mohou být i velmi odlišné. Plastidové genomy mnoha vyšších rostlin a řas byly sekvenovány a charakterizovány. Chloroplastové DNA jsou relativně malé (35–220 kb; 115–217 kb u fotosyntetických organismů) dvouvláknové molekuly, které nesou geny pro proteiny a geny pro strukturální RNA. Počet genů se pohybuje v rozmezí 54 až 259 (u vyšších rostlin obvykle kolem 120). Funkční genové produkty jsou téměř výhradně zahrnuté v transkripci, translaci, fotosyntetickém elektronovém transportu a fotosyntetickém metabolismu.

Uspořádání genů v chloroplastové DNA je poměrně konzervativní mezi různými druhy. Tradičně se předpokládá, že plastidové genomy existují ve formě kružnicových molekul obsahujících jeden pár invertovaných repetič (kopie sekvence DNA mající opačnou orientaci) různé délky (IR), které rozdělují genom na velkou (LSC) a malou (SSC) jednokopiovou oblast. Ve skutečnosti jsou však převažující strukturou zřejmě lineární větvené komplexní molekuly DNA. Velikost a komplexita těchto molekul cpDNA není uniformní a je vývojově regulovaná. Vzhledem k endosymbiotickému původu chloroplastů odpovídá organizace genů a jejich exprese prokaryotické genové expresi, která je však regulována v jádře. Replikace cpDNA probíhá nezávisle na replikaci jaderné DNA, ale je rovněž pod kontrolou jádra. Procesy spojené s replikací cpDNA se v současné době intenzivně studují.

Chloroplasty se do zygoty obvykle nepřenášejí pylovými zrny a chloroplastová dědičnost se tak liší od jaderné dědičnosti, je uniparentální, většinou matroklinní. Paternální dědičnost byla dokumentována u některých druhů rostlin (např. jehličnanů, ale i u mnohých druhů krytosemenných). V některých případech maternální dědičnosti nejsou plastidy přítomny už v samčích pohlavních buňkách, případně

jsou eliminovány během oplození nebo až v zygotě. Některé rostliny mají dědičnost biparentální – dědí plastidy od obou rodičů.

Tvorba chlorofylu ve tmě

Klasické učebnicové poznatky říkají, že vyšší rostliny vytvářejí chlorofyl pouze na světle. Světlo je nejdůležitějším faktorem vnějšího prostředí, který určuje celý průběh biogeneze plastidů. U převážné většiny druhů vyšších rostlin se funkční pigmento-proteinové komplexy vytvářejí pouze na světle, protože syntéza chlorofylu vyžaduje světlo. Rozhodujícím krokem je fotoredukce protochlorofylidu na chlorofylid, která je na světle striktně závislá. Tato reakce je katalyzována enzymem NADPH protochlorofylidoxidázou kódovanou jaderným genomem. Syntéza probíhá v cytoplazmě a následně je enzym transportován do plastidu.

Už poměrně dlouho je však známo, že některé druhy nahosemenných rostlin mají schopnost syntetizovat chlorofyl a vytvářet etiochloroplasty i v úplné tmě. Využívají přitom alternativní protochlorofylidoxidoreduktázu, která na světle nezávisí. Mezi druhy nahosemenných rostlin však existují velké rozdíly, přičemž se projevují i v délce doby, kdy jsou klíčící rostliny schopny syntetizovat chlorofyl ve tmě. Např. smrk ztepilý (*Picea abies*) syntetizuje v úplné tmě poměrně velké množství chlorofylu, a to po dlouhou dobu počátečního růstu. Po 14denní kultivaci v úplné tmě vykazovaly klíčící rostliny smrku 900,7 nmol chlorofylu v 1 g svěží hmotnosti (2 065 nmol u rostliny v podmínkách obvyklého střídání dne a noci). Naproti tomu modřín opadavý (*Larix decidua*) za stejnou dobu ve tmě vytvořil jen 60,7 nmol chlorofylu/g svěží hmotnosti (1 530 nmol/g v běžných podmínkách den/noc). Názorně tento jev ilustruje obr. 8 a tab. 1. Přitom je pozoruhodné, že po 7 dnech ve tmě bylo množství chlorofylu u klíčících rostlin modřínu pětkrát vyšší než po 14 dnech. Lepší schop-

- 2 Proplastid
- 3 Bílkovinné krystaly (šipky) v chloroplastech špenátu. Foto B. Šprey
- 4 Detailní pohled na prolamelární těleso v etioplastu
- 5 Chromoplast. Snímky J. Hudáka, není-li uvedeno jinak
- 6 Submikroskopická struktura amyloplastů. Foto A. Lux
- 7 Stromuli. Podle: A. Holzinger a kol. (Photochemistry and Photobiology 2008, 84: 1324–1335) kreslila M. Chumchalová
- 8 Klíčící rostliny smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*) po 14denní kultivaci ve tmě, nebo na světle. Smrk ve tmě (a) a na světle (b), modřín ve tmě (c) a na světle (d). Foto A. Pavlovič

nost syntetizovat chlorofyl ve tmě mají mladé klíčící rostliny.

Změny v obsahu chlorofylu mladých rostlin rostoucích ve tmě jsou doprovázeny také změnami v ultrastruktuře plastidů. Zatímco u smrku se v plastidech vytvořila velká škrobová zrna a četné tylakoidní membrány, u světle nažloutlých mladých rostlin modřínu klíčících 14 dnů ve tmě byl membránový systém plastidů vyvinut jen velmi slabě. Obecně platí, že vedle ultrastrukturních a fyziologických rozdílů mezi krytosemennými a nahosemennými rostlinami existují i důležité biochemické rozdíly v syntéze chlorofylu. Naše výsledky (Demko a kol. 2009) přispěly k poznání regulačních mechanismů, které se u některých druhů nahosemenných rostlin podílejí na syntéze chlorofylu, a to jak na světle, tak i ve tmě.

Príspevek zazněl na semináři Zabezpečení produktů fotosyntézy ve formě potravin a energie v 21. století, který uspořádala katedra fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty UK v Praze a Česká společnost experimentální biologie rostlin k životnímu jubileu prof. Luboše Nátra.

Tab. 1 Množství chlorofylu (nmol chlorofylu v 1 g svěží hmotnosti) u smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*) po kultivaci 7 nebo 14 dnů ve tmě, nebo v podmínkách obvyklého střídání den/noc. Podle: Demko a kol. (2009)

	Tma 7 dnů	Tma 14 dnů	Tma 14 dnů, pak 24 hodin světlo	Střídání den/noc
Smrk	779	901	1 314	2 065
Modřín	303	61	406	1 530